

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2001年6月28日 (28.06.2001)

PCT

(10) 国際公開番号
WO 01/46451 A1

(51) 国際特許分類: C12P 17/16, C07D 405/06, C12N 1/20, A61K 31/4523, A61P 35/00, 43/00 // (C12P 17/16, C12R 1:465) (C12N 1/20, C12R 1:465)

(21) 国際出願番号: PCT/JP00/09147

(22) 国際出願日: 2000年12月22日 (22.12.2000)

(25) 国際出願の言語: 日本語

(26) 国際公開の言語: 日本語

(30) 優先権データ:
特願平 11/364316

1999年12月22日 (22.12.1999) JP

(71) 出願人 (米国を除く全ての指定国について): 財団法人 微生物化学研究会 (ZAIDAN HOJIN BISEIBUTSU KAGAKU KENKYU KAI) [JP/JP]; 〒141-0021 東京都品川区上大崎3丁目14番23号 Tokyo (JP).

(72) 発明者: および

(75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 竹内富雄 (TAKEUCHI, Tomio) [JP/JP]; 〒141-0022 東京都品川区東五反田5丁目1番11号 ニューフジマンション 701 Tokyo (JP). 澤 力 (SAWA, Tsutomu) [JP/JP]; 〒252-1126 神奈川県綾瀬市綾西四丁目6番7号

Kanagawa (JP). 濱田 雅 (HAMADA, Masa) [JP/JP]; 〒160-0003 東京都新宿区本塩町17番2 Tokyo (JP). 長縄 博 (NAGANAWA, Hiroshi) [JP/JP]; 〒145-0072 東京都大田区田園調布本町3番17号 Tokyo (JP). 高橋良和 (TAKAHASHI, Yoshigazu) [JP/JP]; 〒194-0211 東京都町田市相原町366番地26 Tokyo (JP). 井本正哉 (IMOTO, Masaya) [JP/JP]; 〒234-0054 神奈川県横浜市港南区港南台7丁目3番13号 Kanagawa (JP). 中榮功一 (NAKAE, Kouichi) [JP/JP]; 〒345-0835 埼玉県南埼玉郡宮代町宮代台三丁目2番7号 Saitama (JP).

(74) 代理人: 弁理士 八木田茂, 外 (YAGITA, Shigeru et al.); 〒105-0003 東京都港区西新橋1丁目1番15号 物産ビル別館 Tokyo (JP).

(81) 指定国 (国内): AU, CA, CN, JP, US.

(84) 指定国 (広域): ヨーロッパ特許 (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR).

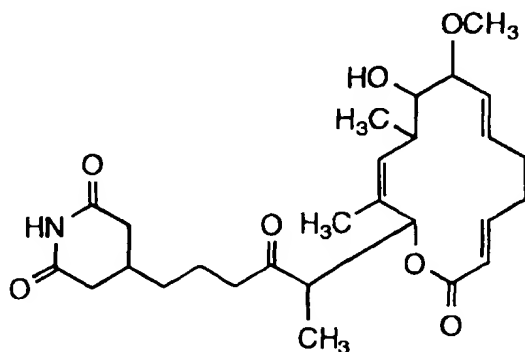
添付公開書類:

- 国際調査報告書
- 請求の範囲の補正の期限前の公開であり、補正書受領の際には再公開される。

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

(54) Title: MIGRASTATIN, PROCESS FOR PRODUCING THE SAME AND MEDICINAL COMPOSITIONS

(54) 発明の名称: マイグラスタチンおよびその製造法ならびに医薬組成物



(I)

(57) Abstract: Migrastatin represented by formula (I) is obtained by culturing a *Streptomyces* sp. MK929-43F1 strain. Migrastatin has an anticancer activity against various human cancers or tumor cells, a cell motility inhibitory activity, and an angiogenesis inhibitory activity on vascular endothelial cells.

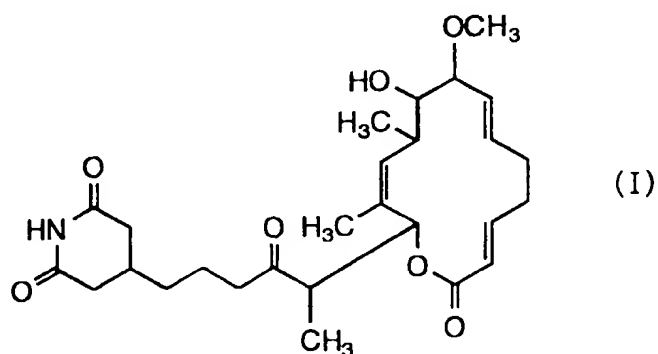
[続葉有]

WO 01/46451 A1



(57) 要約:

次式 (I)



で示されるマイグラストアチン(migrastatin) がストレプトミセス・エスピー MK929-43F1 株の培養により得られた。マイグラストアチンは、各種のヒト癌または腫瘍細胞に対して抗癌活性を有し、また細胞の運動能の阻害活性ならびに血管内皮細胞による血管新生の阻害活性を有する。

明 細 書

マイグラストアチンおよびその製造法ならびに医薬組成物

技術分野

本発明は、細胞運動能の阻害活性および抗腫瘍活性ならびに血管新生の阻害活性を有する新規な生理活性物質であるマイグラストアチン(migrastatin)に関する。
また、本発明は、マイグラストアチンからなる細胞運動能阻害剤、ならびにマイグラストアチンを有効成分とする医薬組成物に関する。さらに、本発明はマイグラストアチンの製造法に関する。さらに本発明は、新規微生物としてのストレプトミセス・エスピーMK929-43F1 株又はその変異株を包含する。

10 背景技術

抗腫瘍性物質に関しては、すでに多数の医薬品が実用化されているが、これら既知の抗腫瘍剤は薬効および副作用の点で必ずしも満足できるものではない。

従って、よりすぐれた新規な抗腫瘍性物質を提供する不断の希求があるのが現状である。また、細胞の運動は、種々の因子を細胞が受け取ると、細胞内の情報伝達の機構の活性化を通して促進されることが知られる。

たとえば癌の転移では、まず癌細胞が原発巣からの細胞運動により離脱する。また血管新生においては、血管内皮細胞の運動により血管新生が開始される。このため細胞の運動能を阻害できる物質は、癌転移を阻害すること、また血管新生を阻害することが期待される。そのような細胞運動能の阻害物質は、更に細胞運動および血管新生の機構の解明の道具あるいは試薬としても有用であると期待される。

本発明の目的の一つは、細胞運動能を阻害できる活性をもち、そして抗腫瘍活性または抗癌活性を示すことのできる新しい物質を提供することにある。

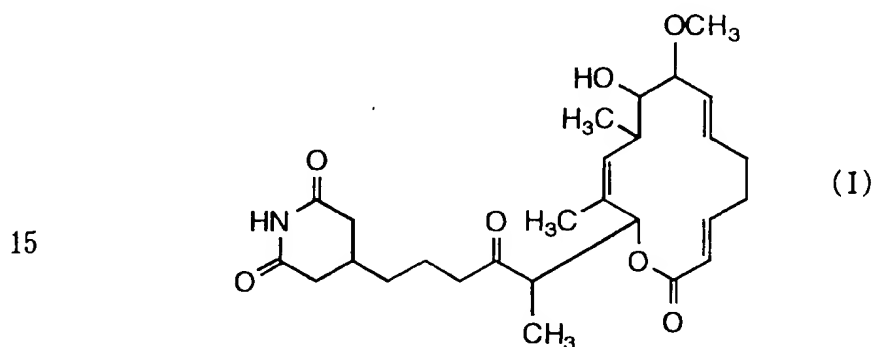
発明の開示

25 本発明者らは、上記のような細胞運動能阻害活性と抗腫瘍活性または抗癌活性を有する新規な物質を発見し、提供する目的で種々研究を重ねた。その研究において、本発明者らは、本発明者らが採取した土壌試料から新たに分離された放線菌で MK929-43F1 の菌株番号を付された微生物を培養し、そしてその培養物から、ヒト腫瘍細胞または癌細胞の増殖阻害活性をもつ物質を単離して取得することに

成功した。

この物質の化学構造を研究して、後記の式 (I) で示される新規な化合物であることを確認した。この式 (I) の新規な化合物をマイグラスタチン(migrastatin)と命名し、さらにマイグラスタチンの生物学的活性を調べる研究を行った。その結果、式 (I) で示される新規化合物であるマイグラスタチンは、各種のヒト癌細胞または腫瘍細胞の増殖阻害活性または癌細胞殺滅活性を示し、またヒト癌細胞の運動能を阻害できる活性を示し、さらにヒト血管内皮細胞の運動能を抑制するとともに、管腔形成能を阻害することによる血管新生の阻害活性を有することが知見された。

10 従って、第1の本発明においては、次式 (I)



で示されるマイグラスタチン(migrastatin) が提供される。

第1の本発明によるマイグラスタチンが前記の式 (I) で示される化学構造を有することは、プロトン核磁気共鳴スペクトル、炭素 13 核磁気共鳴スペクトル、赤外部吸収スペクトル、マススペクトルを詳細に検討することにより決定された。

本発明によるマイグラスタチンは抗腫瘍活性を有し、また癌細胞の運動能の阻害活性を有しており、従ってマイグラスタチンは抗腫瘍剤または抗癌剤として有用であるとともに、細胞運動能阻害剤として有用である。すなわち細胞運動阻害剤としてマイグラスタチンは細胞の癌化などにおける細胞の運動の機構解明の手段として利用できる。さらに、マイグラスタチンは、ヒト血管内皮細胞の運動能及び管腔形成能を阻害できる活性を有するので、血管新生阻害剤として有用であると期待できる。

マイグラスタチンの物理化学的性状を下記に示す。

- (1) 外観：無色粉末
- (2) 融点：54～55°C
- (3) 分子式： $C_{27}H_{39}NO_7$
- (4) 高分解能マスペクトル

5 実験値： m/z 490.2775(M+H)⁺

 計算値： m/z 490.2805(M+H)⁺

- (5) 比旋光度： $[\alpha]_D^{27}$ +17.8° (c 3.48, メタノール)
- (6) 赤外部吸収スペクトル添付図面の第1図に示す
- (7) 紫外部吸収スペクトル：末端吸収
- 10 (8) プロトン核磁気共鳴スペクトル：添付図面の第2図に示す
- (9) 炭素 13 核磁気共鳴スペクトル：添付図面の第3図に示す
- (10) 薄層クロマトグラフィー (シリカゲル 60F₂₅₄(メルク社製))

展開溶媒としてクロロホルム-メタノール(10:1)で展開した時の Rf 値は 0.45 である。

- 15 さらに、マイグラスタチンの生物学的活性を下記に説明する。本発明によるマイグラスタチンが抗腫瘍活性を有することを下記の試験例 1、2 および 7 によって例証する。

試験例 1

- 20 ヒト食道癌細胞、EC17 細胞をウェル中で 2×10^4 個/ml となるように 48 ウェルプレートにのせた 5% 血清を含む RPMI1640 培地に入れて培養した。その培地に種々の濃度のマイグラスタチンを添加してマイグラスタチンとともに 37°C で 3 日間、癌細胞を培養した。その後の細胞数をコールターカウンターを用い測定したところ、EC17 細胞の増殖を 50% 阻害できるマイグラスタチンの濃度、すなわち IC₅₀ は 3.0 μ g/ml であることが認められた。

25 試験例 2

ヒト食道癌細胞、TE3 細胞または EC109 細胞、あるいはヒト白血病細胞 Jurkat 細胞を、ウェル中で 4×10^4 個/ml となるように 48 ウェルプレートにのせた 5% 血清を含む RPMI1640 培地に入れて培養した。その培地には種々の濃度のマイグラスタチンを添加してマイグラスタチンとともに 37°C で 2 日間癌細胞を培養した。

その培養後にトリパンプルー細胞外排出試験法を用いてマイグラストチンの癌細胞毒性を調べた。

その結果、TE3細胞では、 $2.0 \mu\text{g/ml}$ の濃度のマイグラストチンは50%の細胞死を起すことが認められた。さらに、EC109細胞およびJurkat細胞では、それぞれに $1.0 \mu\text{g/ml}$ の濃度のマイグラストチンが50%の細胞死を起こすことが認められた。

他方、細胞の運動は、種々の因子を細胞が受け取ると、細胞内の情報伝達機構の活性化を通して促進されることが知られる。ところで、癌細胞は悪性化することにより転移能を獲得する。その転移能を細胞が獲得する要素の一つとして、細胞運動能を有することが必須である。転移能を獲得した癌細胞はまず癌の原発巣からの運動により離脱することが知られている。

マイグラストチンが癌細胞の運動能を阻害する活性を有することを次の試験例3～4により例証する。

試験例3

Chemotaxicell chamber を用いる試験法〔Malliri ら「J. Cell Biol.」143 巻 1087～99 頁(1998)参照〕により細胞運動能におよぼすマイグラストチンの影響を測定した。 1.8×10^5 個/ml となるような運動能を持つヒト食道癌細胞 EC17 細胞を Chemotaxicell chamber 内で、マイグラストチン存在下、EC17 細胞の運動能の変動を測定したところ、濃度依存的にマイグラストチンは EC17 細胞の運動能を阻害した。EC17 細胞の運動能を 50% 阻害する濃度であるマイグラストチンの IC_{50} は $1.0 \mu\text{g/ml}$ であった。

試験例4

Wound healing assay 法〔Malliri ら「J. Cell Biol.」143 巻 1087～99 頁(1998)参照〕を用いて、細胞運動能におよぼすマイグラストチンの影響を測定した。 6×10^4 個/ml となるような運動能を持つヒト食道癌細胞 EC17 細胞を 48 ウェルプレート内で、マイグラストチン存在下、EC17 細胞の運動能の変動を測定したところ、マイグラストチンは濃度依存的に EC17 細胞の運動能を阻害した。この場合、マイグラストチンの $1.0 \mu\text{g/ml}$ の濃度で完全に EC17 細胞の運動を阻害した。

さらに、本発明によるマイグラストチンの血管内皮細胞に対する運動抑制活性

を試験例 5 に、血管新生の阻害活性を次の試験例 6 により示す。

試験例 5 マイグラストアチンによるヒト臍帯静脈内皮細胞の遊走阻害作用

10ng/ml の bFGF (basic fibroblast growth factor)を含む 10%FCS-MCDB131
培地で 1×10^4 個/well となるようにヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC 細胞) の懸濁
5 液を調製し、コラーゲンコートした 96 穴マイクロプレートに撒いた。2 日間培養
し、マイクロプレート底に内皮細胞が全面に生育したことを確認した後、マイク
ロピペットのチップを用いて底面から細胞を直線状に剥ぎ取った。培地を除去後、
PBS で 2 回洗浄した。50 μ l の 10%FCS-MCDB131 培地および 50 μ l のマイグラスト
10 チン試料を含む MCDB131 培地を加え、37°C で一晩培養した。培地を除去後、PBS
で洗浄し、100 μ l の 5%グルタルアルデヒドを加え、室温で 30 分間固定後、水
道水で洗浄しさらに乾燥させた。100 μ l の 0.1%クリスタルバイオレット (in 0.1N
HCl/20%MeOH)を加え 10 分間染色した。水道水で洗浄後に乾燥し、顕微鏡下で細胞
の遊走を観察した。

その結果、マイグラストアチンは HUVEC 細胞の遊走を 25 μ g/ml 以上の濃度で阻害
15 した。

試験例 6

血管新生のモデル系として、 1×10^5 個/ml のヒト臍帯静脈内皮細胞、(HUVEC
細胞)を用いた。HUVEC 細胞を 24 ウェルプレートにまき、fibroblast growth factor
(FGF)10 ng/ml を添加したときの該細胞の管腔形成についてマイグラストアチンの
20 与える影響について調べた〔岸本ら「Arch. Toxicol.」69 巻 10 号 718~21 頁(1995)
参照〕。その結果、HUVEC 細胞の管腔形成は 3.0 μ g/ml のマイグラストアチンで完
全に阻害された。また HUVEC 細胞の細胞増殖抑制活性についても上記の試験例 1
と同様の方法で検討した。その結果、マイグラストアチンは濃度依存的に HUVEC 細
胞についても細胞増殖抑制活性を示した。この場合のマイグラストアチンの IC₅₀ は
25 3.0 μ g/ml であった。

上記のように、本発明のマイグラストアチンは血管内皮細胞による血管新生を阻
害できる活性をも有することが示された。

さらに、次の試験例 7 で、DNA 合成、RNA 合成、蛋白合成に対する影響を調べた
ところ、従来の抗腫瘍剤の多くに見られた DNA 合成の阻害作用は認められなかつ

た。これらの事は、マイグラストアチンが新しい作用機序に基づき、癌遺伝子が形質転換された細胞や癌化した細胞で特異的に作られる分子の RNA/蛋白合成を阻害している可能性を示している。

試験例 7 マイグラストアチンの高分子合成阻害

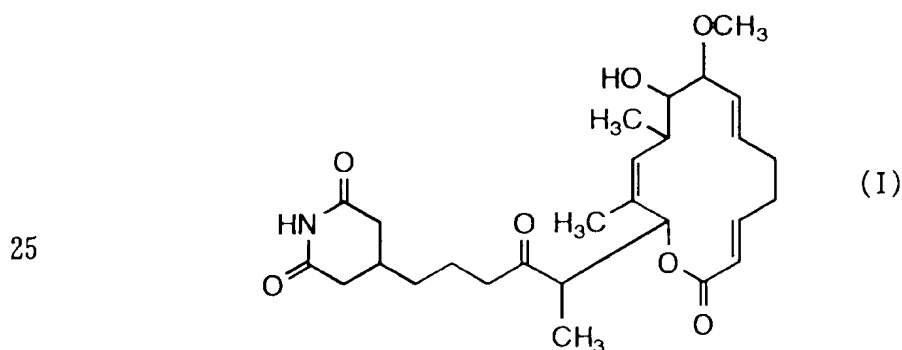
- 5 5%血清を含む RPMI1640 培地に懸濁した 2.5×10^5 個のヒト小細胞肺癌 Ms-1 細胞を 24 ウェルプレートに撒き、一日培養後、培地を無血清培地に交換した後、各濃度のマイグラストアチンを添加した。30 分間インキュベートの後、 $1 \mu\text{Ci}$ のトリチウムラベルされたチミジン、ウリジン、およびロイシンをそれぞれ添加し、更に 1 時間インキュベートした。培地を除いた後、10%トリクロロ酢酸(TCA)を加え、
- 10 30 分後 TCA 不溶画分の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて測定した。

その結果、マイグラストアチンは、ヒト小細胞肺癌 Ms-1 細胞の DNA 合成阻害を誘導することなく RNA および蛋白合成を $60 \sim 75 \mu\text{g/ml}$ の濃度で 50%阻害した。

- 15 なお、マイグラストアチンの急性毒性を評価するために、マイグラストアチンを 10% ジメチルスルホキシドおよびツィーン 80 含有の生理食塩水に溶解して溶液を作り、その溶液をマウスの静脈に注射して 14 日間観察した。その結果、マイグラストアチンは 100 mg/kg での静注投与で毒性を示さなかった。

第 1 の本発明によるマイグラストアチンは、前記したように種々な生物学的活性を有するものである。

- 20 第 2 の本発明においては、次式 (I)



で示されるマイグラストアチンからなる細胞運動能阻害剤が提供される。

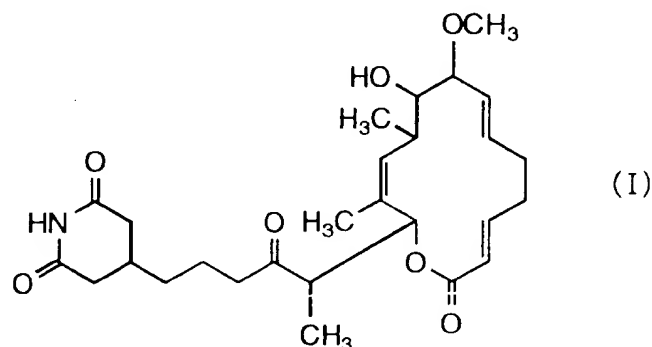
マイグラストアチンよりなる第 2 の本発明による細胞運動能阻害剤は、癌の転移

または血管内皮細胞の血管新生における細胞の運動の機構の解明の試薬として用いられ、また癌転移、あるいは血管新生などを標的とした治療剤として使用できる可能性を有している。

第3の本発明においては、次式(I)

5

10



で示されるマイグラストチンを有効成分とする医薬組成物が提供される。

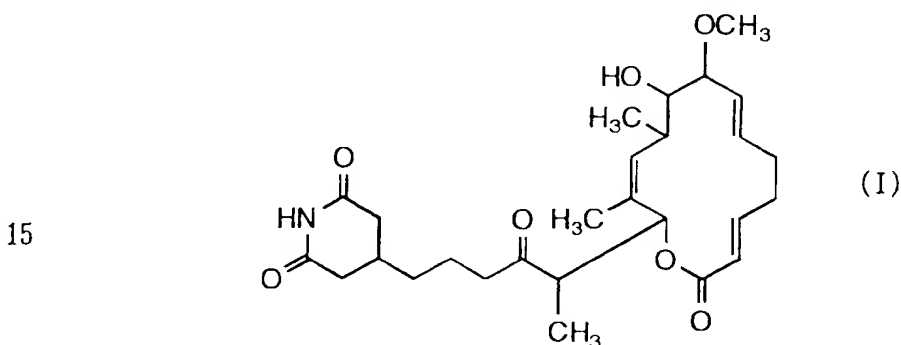
第3の本発明の医薬組成物は、抗腫瘍剤又は血管新生阻害剤の形であることができる。第3の本発明による医薬組成物では、有効成分としてのマイグラストチンと混和される担体を配合できる。その担体は、製薬学的に許容できる固体または液体の担体、例えばスターチ、乳糖、水、エタノール、含水エタノールであることができる。

抗腫瘍剤又は血管新生阻害剤としてマイグラストチンを用いる場合、マイグラストチン（本発明化合物）は合目的な任意の投与経路で投与でき、また、採用投与経路によって決まる投薬量で投与できる。また投与の都度、経路を変えて投与することができる。製薬学上許容される担体あるいは希釈剤で希釈された製剤の形で投与されるのが普通である。一般的には製剤はマイグラストチンを 0.01～100 重量%、好ましくは 0.1～70 重量%含み、残りとして製薬学上許容される担体およびその他の補助剤を含む。

抗腫瘍剤又は血管新生阻害剤として本発明化合物を実際に投与する場合には、マイグラストチンを注射用蒸留水または生理食塩水に溶解した溶液として注射する方法が一つの代表的な投与方法である。具体的には、動物の場合には腹腔内注射、皮下注射、静脈、動脈への血管内注射、および注射による局所投与などの方法を利用できる。

マイグラスタチンの投与量は、種々の状況を勘案して、連続的または間欠的に投与したときに総投与量が一定量を超えないように定められ、通常成人1人1日当たり0.01~800mg程度である。具体的な投与量は、投与方法、患者または被処理動物の状況、例えば年齢、体重、性別、感受性、食餌、投与時間、併用する薬
5 剤、患者またはその病気の程度に応じて変化することは言うまでもない。また一定の条件のもとにおけるマイグラスタチンの投与の適量と投与回数は、上記指針をもとに専門医の適量決定試験によって決定されなければならない。

第4の本発明においては、ストレプトミセス属に属して式(I)で示されるマイグラスタチンを生産する菌を培地で培養し、その培養物よりマイグラスタチン
10 を採取することを特徴とする、次式(I)



で示されるマイグラスタチンの製造法が提供される。

第4の本発明によるマイグラスタチンの製造方法で用いられるマイグラスタチン (migrastatin) の生産菌の好ましい一例は、平成10年1月、微生物化学研究所において、静岡県熱海市の土壌より分離された放線菌で、MK929-43F1の菌株番号が付された菌である。

次に、MK929-43F1株の菌学的性質を下記に示す。

1. 形態

25 MK929-43F1株は、分枝した基生菌糸より比較的長い気菌糸を伸長し、輪生枝を形成する。成熟した孢子鎖は3~10個の円筒形の孢子を連鎖する。孢子の大きさは約0.4~0.7×1.1~1.4ミクロンであり、孢子の表面は平滑である。なお、らせん形成、菌束糸、孢子のうおよび運動性孢子は認められない。

2. 各種培地における生育状態

色の記載について [] 内に示す色の標準は、コンティナー・コーポレーション・オブ・アメリカのカラー・ハーモニー・マニュアル (Container Corporation of America の color harmony manual) を用いた。

(1) スクロース・硝酸塩寒天培地 (27°C培養)

- 5 無色の発育上に、白の気菌系をうっすらと着生し、気菌系は部分的に黄味灰 [1 cb, Parchment] の綿状を呈する。溶解性色素は認められない。

(2) イースト・麦芽寒天培地 (ISP-培地 2、27°C培養)

- うす黄茶 [2 ie, Lt Mustard Tan] の発育上に、白の気菌系をうっすらと着生し、培養後 3 週目になると部分的に黄味灰 [1 cb, Parchment] を呈する。溶解性色素は認められない。
- 10

(3) オートミール寒天培地 (ISP-培地 3、27°C培養)

うす黄 [1 ca, Pale Yellow] ～うす黄茶 [2 gc, Bamboo] の発育上に、白の気菌系をわずかに着生する。溶解性色素は認められない。

(4) スターチ・無機塩寒天培地 (ISP-培地 4、27°C培養)

- 15 うす黄 [1 ca, Pale Yellow] の発育上に、黄味灰 [1 1/2 ca, Cream] の気菌系を綿状に着生し、溶解性色素は認められない。

(5) グリセリン・アスパラギン寒天培地 (ISP-培地 5、27°C培養)

うす黄 [1 ca, Pale Yellow ～ 1 1/2 ea, Lt Yellow] の発育上に、黄味灰 [1 1/2 ca, Cream] の気菌系をうっすらと着生し、溶解性色素は認められない。

- 20 (6) チロシン寒天培地 (ISP-培地 7、27°C培養)

うす黄 [1 ca, Pale Yellow] ～灰味黄茶 [2 ig, Slate Tan] の発育上に、黄味灰 [1 1/2 ca, Cream] の気菌系をうっすらと着生する。溶解性色素はかすかに茶色味を帯びる。

3. 生理的性質

- 25 (1) 生育温度範囲

イースト・スターチ寒天培地 (イーストエキス 0.2%、溶性デンプン 1.0%、ひも寒天 2.4%、pH 7.0) を用い、10°C、20°C、24°C、27°C、30°C、37°C、45°C、50°C の各温度で MK929-43F1 株の生育を試験した結果、45°C、50°C を除き、そのいずれの温度でも生育する。生育至適温度は 30°C 付近である。

(2) スターチの加水分解 (スターチ・無機塩寒天培地、ISP-培地 4、27°C 培養)

培養後 7 日目頃より、スターチの加水分解を認め、その作用は中等度である。

(3) メラニン様色素の生成 (トリプトン・イースト・ブロス、ISP-培地 1 ; ペプトン・イースト・鉄寒天培地、ISP-培地 6 ; チロシン寒天培地、ISP-培地 7 ; い

5 ずれも 27°C 培養)

トリプトン・イースト・ブロスおよび ペプトン・イースト・鉄寒天培地では陽性、チロシン寒天培地は陰性である。

(4) 炭素源の利用性 (ブリドハム・ゴトリブ寒天培地、ISP-培地 9、27°C 培養)

10 D-グルコースおよびイノシトールを利用して発育し、D-フラクトースをおそらく利用する。L-アラビノース、D-キシロース、スクロース、ラフィノース、ラムノースおよび D-マンニトールは利用しない。

(5) 硝酸塩の還元反応 (0.1%硝酸カリウム含有ペプトン水、ISP-培地 8、27°C 培養)

15 陰性である。

以上の性状を要約すると、MK929-43F1 株は、分枝した基生菌系より比較的長い気菌系を伸長し、輪生枝を形成する。成熟した孢子鎖には 3~10 個あるいはそれ以上の円筒形の孢子を連鎖し、その表面は平滑である。種々の培地で、うす黄~うす黄茶の発育上に白~黄味灰の気菌系を着生し、溶解性色素は認められない。

20 生育至適温度は、30°C 付近である。メラニン様色素の生成はトリプトン・イースト・ブロスおよびペプトン・イースト・鉄寒天培地では陽性、チロシン寒天培地は陰性である。スターチの水解性は中等度、硝酸塩の還元反応は陰性である。なお、細胞壁に含まれる 2,6-ジアミノピメリン酸は LL-型であった。菌体成分の主要なメナキノン、MK-9(H6)である。

25 これらの性状より、MK929-43F1 株はストレプトミセス (*Streptomyces*) 属に属すると考えられる。MK929-43F1 株を日本国、茨城県つくば市東 1 丁目 1 番 3 号に在る工業技術院生命工学工業技術研究所に寄託申請し、1999 年 9 月 21 日、受託番号 FERM P-17574 として受託された。さらに、MK929-43F1 株は、前記の研究所にブダベスト条約の規約下に 2000 年 5 月 19 日の移管寄託日で FERM BP-7166 の受

託番号で受託されてある。

なお、MK929-43F1 株は現時点でストレプトミセス・エスピー(*Streptomyces sp.*)とされたが、この株は下記の諸点①～④でストレプトミセス・ケスピトースス(*Streptomyces caespitosus* 文献 International Journal of Systematic

5 Bacteriology 22 巻、281 頁、1972 年)に類似していることを付記する。

- ① 形態が輪生枝を形成する。
- ② 発育(基生菌系)が特色ある黄色を呈する。
- ③ 炭素源の利用性が近似している。
- ④ MK929-43F1 菌株は、抗生物質マイトマイシンも生産する。

10 第4の本発明方法によって、マイグラストアチンの培養的製造を行うに当っては、ストレプトミセス属に属するマイグラストアチン生産菌を適切な培地で好氣的に培養し、その培養物から目的物のマイグラストアチンを採取することによってマイグラストアチンを製造することができる。用いる培地の組成は、マイグラストアチン生産菌が利用しうる任意の栄養源を含有するものでありうる。具体的には、たとえば、炭素源としてグルコース、ガラクトース、グリセロール、デキストリン、スクロース、マルトース、スターチ及び油脂類などが使用できる。また、窒素源として大豆粉、綿実粕、乾燥酵母、酵母エキスおよびコーンステイーブリカーなどの有機物並びに、アンモニア塩または硝酸塩、たとえば硫酸アンモニウム、硝酸ナトリウムおよび塩化アンモニウムなどの無機塩類が利用できる。また必要に応じて炭酸カルシウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、磷酸塩、重金属塩などの無機塩類を添加することができる。発酵中の発泡を抑制する為に、常法にしたがって適当な消泡剤、たとえばシリコーン油を添加することもできる。

培養方法としては、一般に用いられている抗生物質の生産方法と同様に、好氣的液体培養法がもっとも適している。培養温度は 20-30°C が適切であるが、25 25-30°C が好ましい。この培養方法でマイグラストアチンの生産量は、振とう培養法、または通気攪拌培養法の何れでも培養 5 日間で最高に達する。

このようにして、マイグラストアチンの蓄積された培養物が得られる。この培養物中では、マイグラストアチンは主に培養濾液中に存在する。

このようにして得られた培養物または培養濾液からマイグラストアチンを採取す

るには合目的な任意の方法が利用可能である。そのひとつの方法は抽出の原理を用いる方法に基づくものであって、具体的には、培養濾液中のマイグラストアチンを水不混和性の溶剤、たとえば酢酸エチルなどで抽出できる。

培養物からマイグラストアチンを採取するほかの一つの方法は吸着の原理を用いる方法に基づくものであって、すでに液状になっているマイグラストアチン含有物、たとえば培養濾液あるいは上記の抽出操作を行うことによって得られた抽出液を利用して、適当な吸着剤、たとえばシリカゲルを用いて目的のマイグラストアチンを吸着させ、その後、適当な溶媒で溶離させることによってマイグラストアチンを得ることができる。このようにして得られたマイグラストアチン溶液を減圧下に濃縮乾固して、マイグラストアチンの粗精製物が得られる。

このようにして得られたマイグラストアチンの粗精製物をさらに精製する為には、上記の抽出法、吸着法およびゲル濾過法などを必要に応じて組み合わせ必要回数おこなえばよい。具体的には、たとえばマイグラストアチン粗精製物をヘキサン-酢酸エチル系で展開されるシリカゲルクロマトグラフィーに供し、その後、メタノール系で展開されるゲル濾過法にかけることにより、マイグラストアチンの純品を得ることができる。

マイグラストアチンは、現在のところ、第4の本発明方法において微生物の培養によって得られているけれども、類縁化合物の合成、化学的修飾によって製造することも、あるいは全合成化学的に製造することもできよう。また、遺伝子工学的手法によることもできよう。すなわち、マイグラストアチン生産遺伝子を適当な微生物、例えば大腸菌に組み込み、このような形質転換微生物を培養し、この培養物から得ることも可能である。また、第4の本発明方法で利用できる菌株としては、ストレプトミセス属に属するマイグラストアチン生産能を有する菌株が使用される。具体的には、本発明者らが分離したストレプトミセス・エスピー MK929-43F1 株がマイグラストアチン生産菌であることが本発明者等によってあきらかにされているが、本発明方法で利用できるその他の菌株としては、有用物質生産菌の単離の常法によって適切なマイグラストアチン生産菌を自然界より分離することが可能である。

また、ストレプトミセス・エスピー MK929-43F1 株を含めて、マイグラストアチン

の生産能をもつ菌を放射線照射またはその他の変異化方法で処理することによって、マイグラストチンの生産能を高める余地も残されている。さらに、遺伝子工学的手法によるマイグラストチンの生産も可能性がある。

- さらに、第5の本発明においては、有用で新規な微生物として、マイグラストチンを生産する特性を有するストレプトミセス・エスピーMK929-43F1株またはその変異株が提供される。このMK929-43F1株は、前記のと通りの菌学的性質を有するものであり、そして前記の工業技術院生命工学工業技術研究所にブダベスト条約の規約下に FERM BP-7166 の寄託番号で寄託されてある。

図面の簡単な説明

- 10 添付図面の第1図はマイグラストチンの赤外線吸収スペクトルを示す。
- 添付図面の第2図はマイグラストチンのプロトン核磁気共鳴スペクトル（重クロロホルム中、500MHz）を示す。
- 添付図面の第3図はマイグラストチンの炭素13核磁気共鳴スペクトル（重クロロホルム中、125MHz）を示す。

- 15 発明を実施するための最良の形態

次に、本発明を下記の実施例について具体的に説明する。

実施例1

マイグラストチンの製造

- 寒天斜面培地に培養したストレプトミセス・エスピー MK929-43F1 株(FERM
20 P-17574)を、デキストリン 2%、グリセロール 2%、ソイベプトン 1%、イーストエキストラクト（和光）0.3%、硫酸アンモニウム 0.2%、炭酸カルシウム 0.2%を含む液体培地（pH7.4に調整）を三角フラスコ（500ml 容）に、100ml ずつ分注してから、常法により 120℃で 20 分間滅菌した培地に接種した。その後、培地中で MK929-43F1 株を 27℃で 2 日間回転振とう培養した。これにより種母培養液を得た。
- 25 この種母培養液を、上記の種母培養に用いたものと同様の液体培地を三角フラスコ（500ml 容）に 100ml ずつ分注してから、常法により 120℃で 20 分間滅菌した培地に、2%量で接種し、27℃で 5 日間回転振とう培養した。

この様にして得られた培養液（5000ml）を濾過した。得られた培養濾液を等量の酢酸エチルで抽出した。酢酸エチル抽出液を減圧下に濃縮し、得られた残留

物 (1220.1mg) をシリカゲルカラム (メルク社製キーゼルゲル (4 cm ϕ \times 15 cm)) に吸着させ、クロロホルム-メタノール (100 : 1) で溶出された活性画分を濃縮乾固して、314.0mg の粗精製物を得た。

- これをさらに、シリカゲルカラム (4 cm ϕ \times 15 cm) に吸着させて、ヘキサ
5 ン-酢酸エチル (1 : 1 ~ 1 : 2) で展開して、溶出された活性画分を濃縮乾固
することにより、42.1mg の活性画分を得た。次いで、この活性画分をセファデ
ックス LH20 カラム (4 cm ϕ \times 40 cm) にかけて、メタノールで展開して、最終
的に精製されたマイグラストアチン 6.0mg を得た。得られたマイグラストアチンは
無色粉末であり、54~55°C の融点を示した。

10 産業上の利用可能性

- 以上の説明から明らかなように、本発明によって得られたマイグラストアチンは、
各種のヒト癌細胞の増殖阻害活性または癌細胞殺滅活性を示し、また細胞、特に
ヒト癌細胞の運動能を阻害できる活性を示し、さらにヒト血管内皮細胞の運動能
を抑制するとともに、管腔形成能を阻害することによる血管新生の阻害活性を有
15 するものである。従って、マイグラストアチンは抗腫瘍剤あるいは血管新生阻害剤
として有用である。

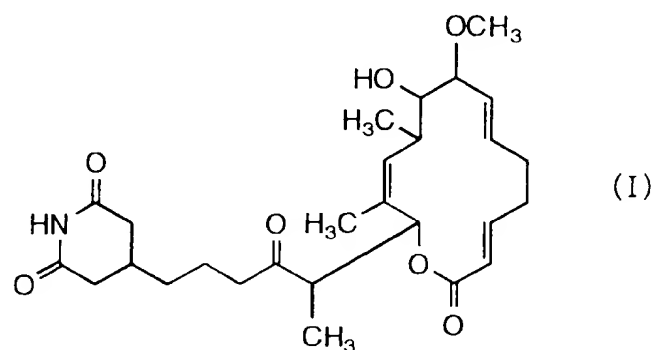
20

25

請求の範囲

1. 次式 (I)

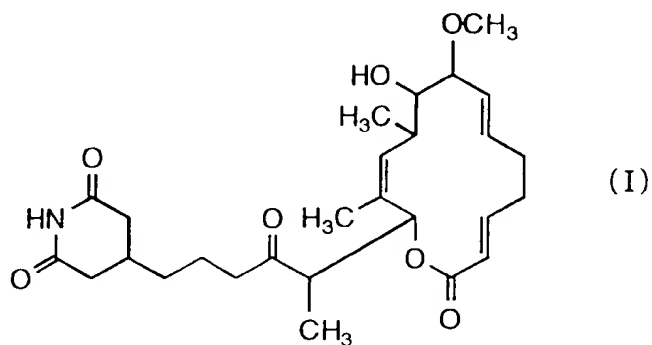
5



10 示されるマイグラスタチン(migrastatin)。

2. 次式 (I)

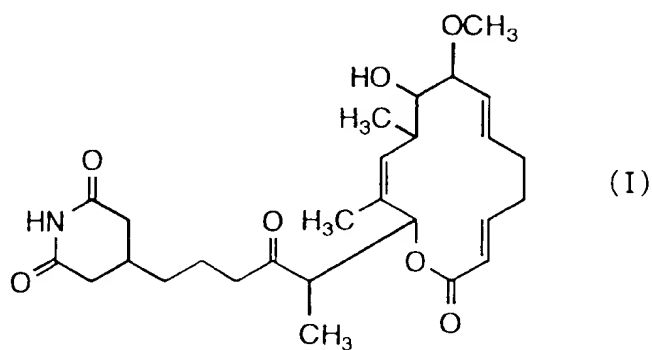
15



示されるマイグラスタチンからなる細胞運動能阻害剤。

20 3. 次式 (I)

25



示されるマイグラスタチンを有効成分とする医薬組成物。

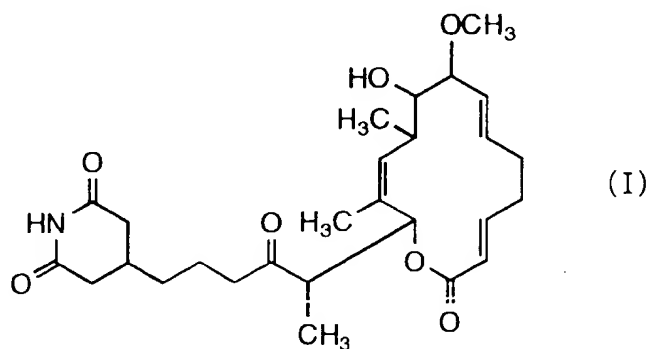
4. 抗腫瘍剤である請求の範囲3に記載の医薬組成物。

5. 血管新生阻害剤である請求の範囲3に記載の医薬組成物。

6. ストレプトミセス属に属して下記の式(I)で示されるマイグラスタチンを生産する菌を培地で培養し、その培養物よりマイグラスタチンを採取することを特徴とする、次式(I)

5

10



で示されるマイグラスタチンの製造法。

7. マイグラスタチンを生産する特性を有するストレプトミセス・エスピー MK929-43F1 株又はその変異株。

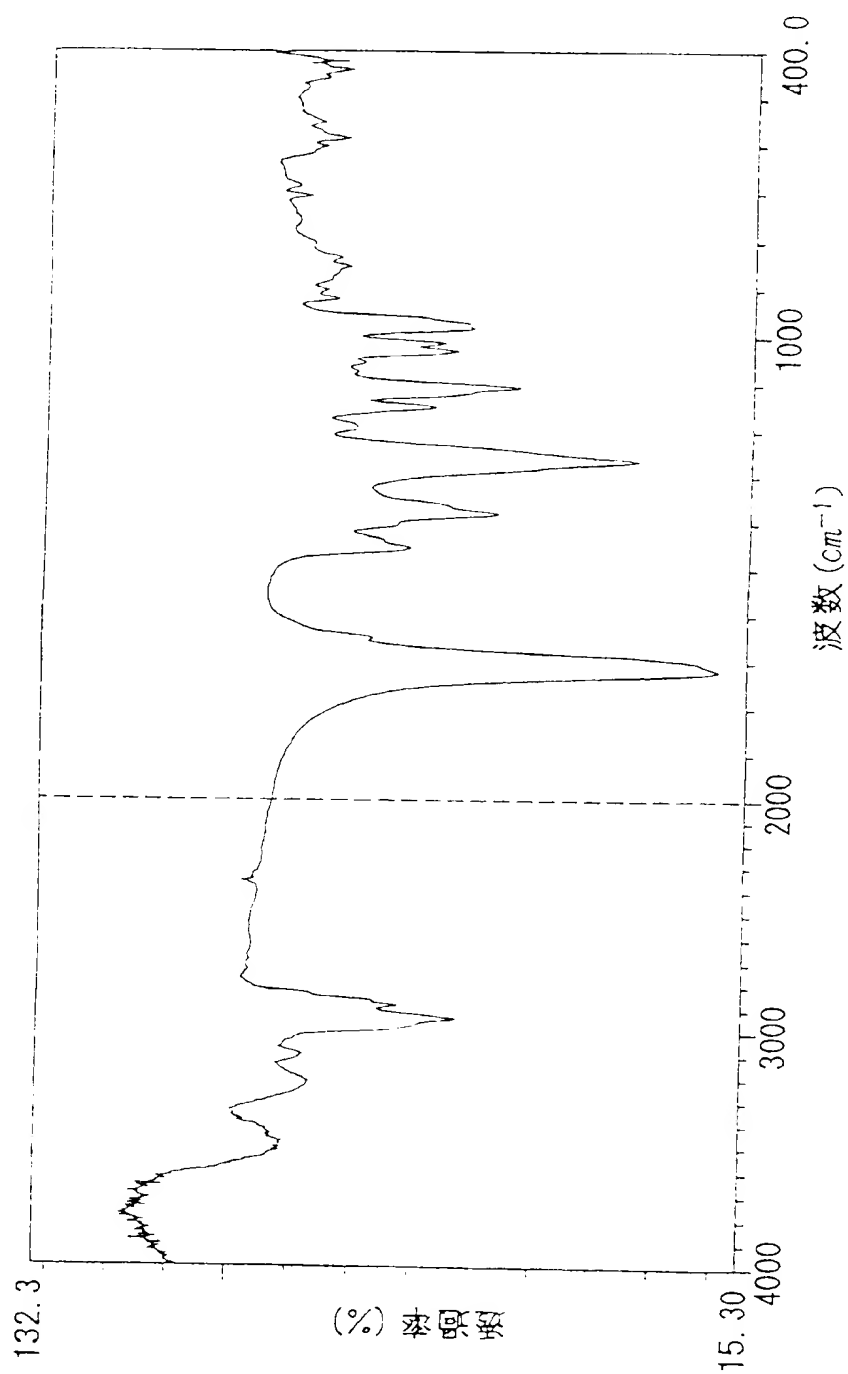
15

20

25

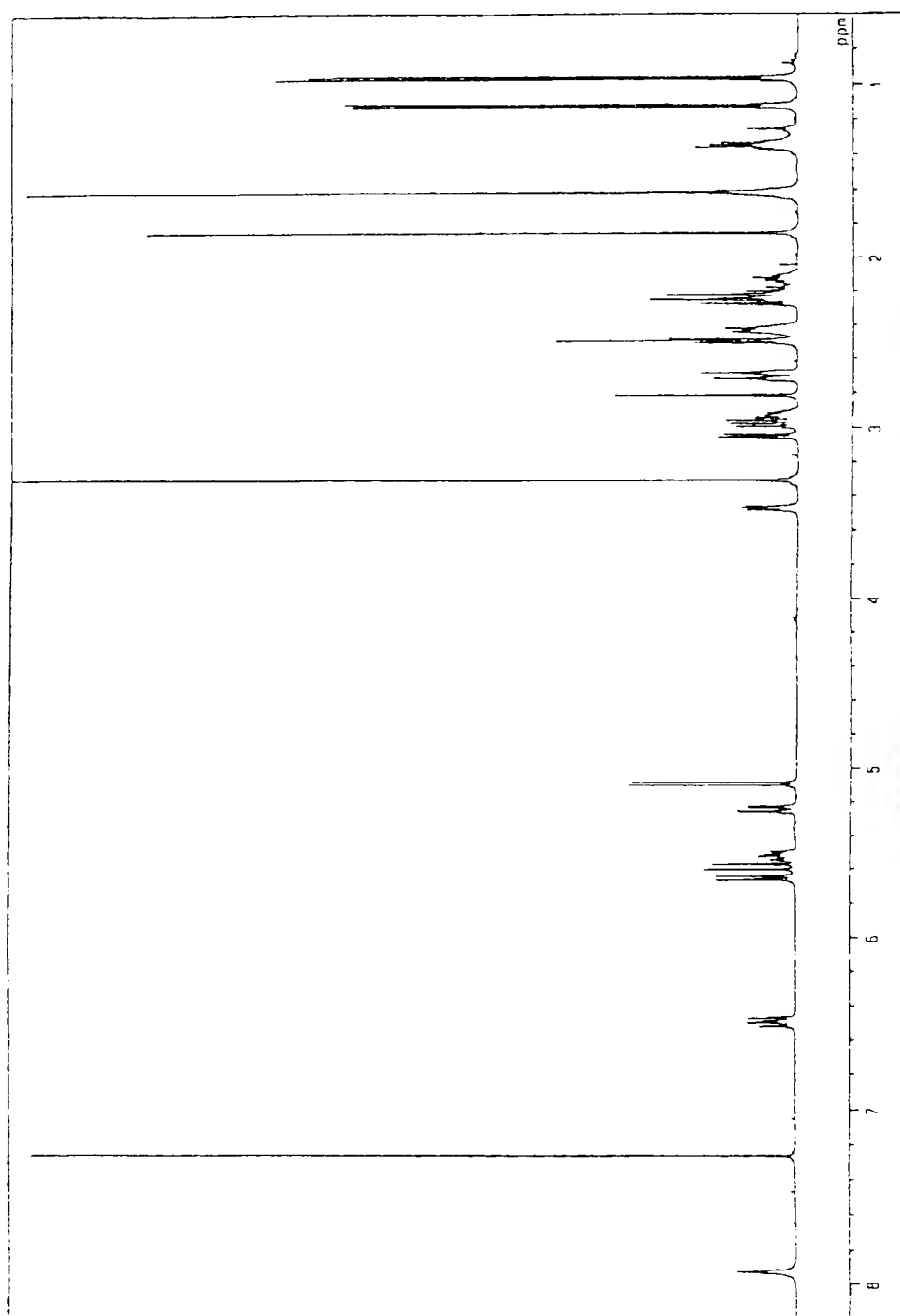
1 / 3

第 1 図



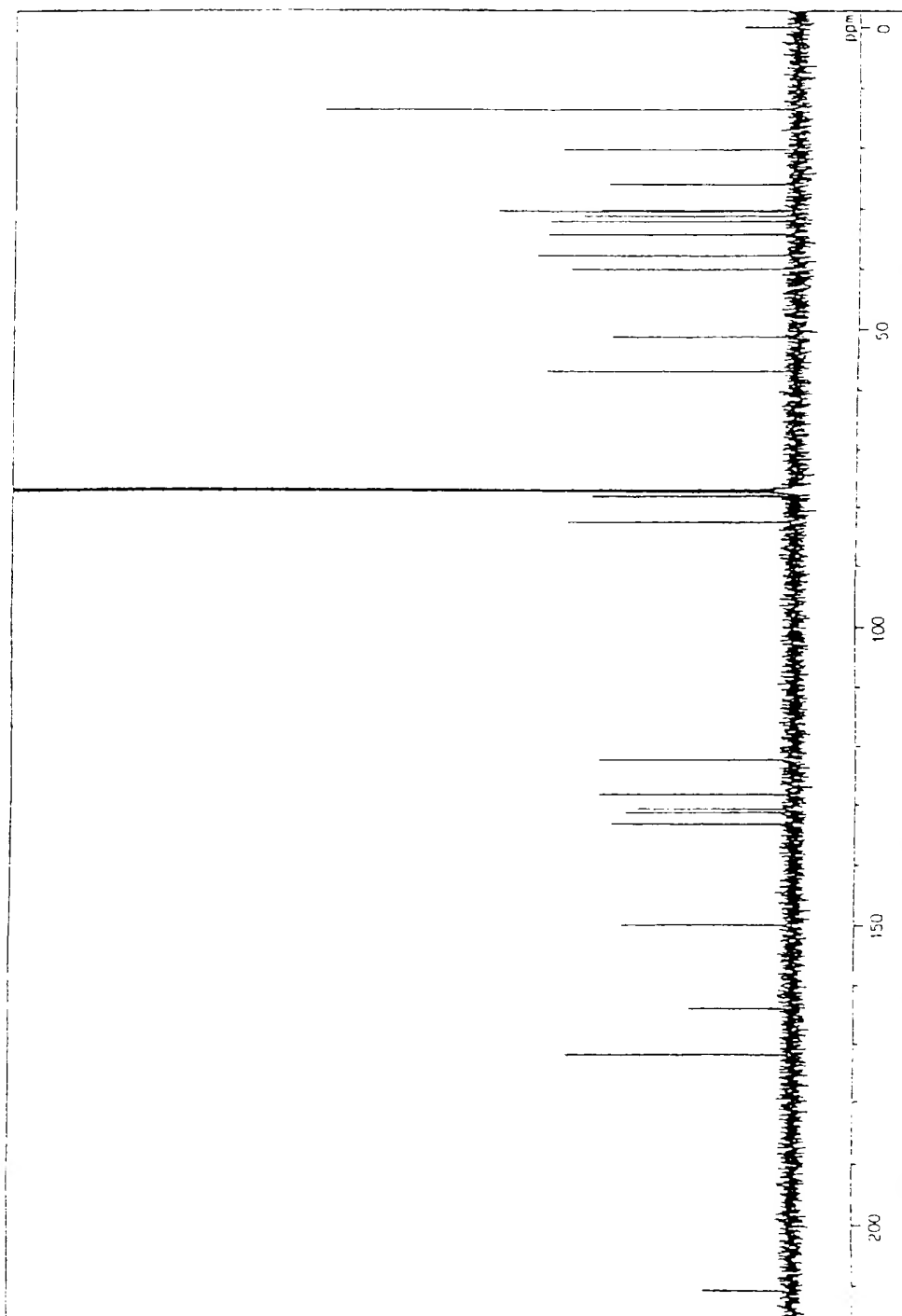
2 / 3

第 2 図



3 / 3

第 3 図



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09147

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12P 17/16, C07D 405/06, C12N 1/20, A61K 31/4523, A61P 35/00, 43/00
 // (C12P 17/16, C12R 1:465) (C12N 1/20, C12R 1:465)

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12P 17/16, C07D 405/06, C12N 1/20, A61K 31/4523, A61P 35/00, 43/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 CA (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG),
 JICST FILE (JOIS)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P,X	Koichi Nakae et al., "Migrastatin, a Novel 14-Membered Lactone from Streptomyces sp.MK929-43F1.", J. Antibiot. (2000) Vol.53, No.10, pp.1228-1230	1-7
P,X	Koichi Nakae et al., "Migrastatin, a New Inhibitor of Tumor Cell Migration from Streptomyces sp.MK929-43F1.", J. Antibiot. (2000) Vol.53, No.10, pp.1130-1136	1-7
A	JP, 7-138257, A (Taisho Pharmaceutical Co., Ltd.), 30 May, 1995 (30.05.95) (Family: none)	1-7
A	EP, 432697, A2 (Bristol-Myers Squibb Co.), 19 June, 1991 (19.06.91) & JP, 3-181432, A & US, 5002959, A	1-7
A	Jill E. Hochlowski et al., "Dorrigocins: novel antifungal antibiotics that change the morphology of ras-transformed NIH/3T3 cells to that of normal cells. II. Isolation and elucidation of structures.", J. Antibiot. (1994) Vol.47, No.8, pp.870-874	1-7
A	Koko Sugawara et al., "Lactimidomycin, a new glutarimide	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier document but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search
03 April, 2001 (03.04.01)

Date of mailing of the international search report
17 April, 2001 (17.04.01)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP00/09147

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
	groupantibiotic. Production, isolation, structure and biological activity.", J. Antibiot. (1992) Vol.45, No.9, pp.1433-1441	

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P 17/16, C07D 405/06, C12N 1/20, A61K 31/4523, A61P 35/00, 43/00
 //(C12P 17/16, C12R 1:465) (C12N 1/20, C12R 1:465)

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ C12P 17/16, C07D 405/06, C12N 1/20, A61K 31/4523, A61P 35/00, 43/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

CA (STN), REGISTRY (STN), MEDLINE (STN), WPI (DIALOG), BIOSIS (DIALOG), JICSTファイル (JOIS)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
P, X	Koichi Nakae et al., "Migrastatin, a Novel 14-Membered Lactone from <i>Streptomyces</i> sp. MK929-43F1.", J. Antibiot. (2000) Vol. 53, No. 10, p. 1228-1230	1-7
P, X	Koichi Nakae et al., "Migrastatin, a New Inhibitor of Tumor Cell Migration from <i>Streptomyces</i> sp. MK929-43F1.", J. Antibiot. (2000) Vol. 53, No. 10, p. 1130-1136	1-7
A	JP, 7-138257, A (大正製薬株式会社) 30.5月. 1995 (30.05.95) (ファミリーなし)	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。

☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
 「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
 「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
 「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

03.04.01

国際調査報告の発送日

17.04.01

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号 100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

本間 夏子



4N

2937

電話番号 03-3581-1101 内線 3488

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	EP, 432697, A2 (Bristol-Myers Squibb Co.) 19. 6月. 1991 (19. 06. 91) & JP, 3-181432, A & US, 5002959, A	1-7
A	Jill E. Hochlowski et al., "Dorrigocins: novel antifungal antibiotics that change the morphology of ras-transformed NIH/3T3 cells to that of normal cells. II. Isolation and elucidation of structures.", J. Antibiot. (1994) Vol. 47, No. 8, p. 870-874	1-7
A	Koko Sugawara et al., "Lactimidomycin, a new glutarimide group antibiotic. Production, isolation, structure and biological activity.", J. Antibiot. (1992) Vol. 45, No. 9, p. 1433-1441	1-7